

(1) D E 37 86 279 (E P 0 238 352 B1)

A b s t r a c t n o t a v a i l a b l e f o r D E 3786279

A b s t r a c t o f c o r r e s p o n d i n g d o c u m e n t: **US4906565**

A m e t h o d f o r t h e s e l e c t i v e d e t e r m i n a t i o n o f  
m i c r o b i a l c e l l s , i n a s a m p l e s u s p e c t e d o f c o n t a i n i n g  
b o t h m i c r o b i a l a n d n o n - m i c r o b i a l c e l l s , i s  
d e s c r i b e d w h i c h i n v o l v e s t h e s e l e c t i v e r e l e a s e a n d  
e n z y m a t i c i n a c t i v a t i o n o f n o n - m i c r o b i a l  
n u c l e o t i d e s , f o l l o w e d b y t h e r a p i d a n d s p e c i f i c  
i n h i b i t i o n o f t h e i n a c t i v a t i n g e n z y m e a n d t h e  
r e l e a s e a n d d e t e c t i o n o f m i c r o b i a l n u c l e o t i d e s i n a n  
a p p r o p r i a t e a s s a y , s u c h a s a b i o l u m i n e s c e n t a s s a y .

**BEST AVAILABLE COPY**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 238 352 B1

⑩ DE 37 86 279 T 2

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 Q 1/04**  
C 12 Q 1/48

②1	Deutsches Aktenzeichen:	37 86 279.0
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	87 302 424.4
⑧6	Europäischer Anmeldetag:	20. 3. 87
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	23. 9. 87
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	23. 6. 93
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	18. 11. 93

DE 37 86 279 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
21.03.86 US 842628

⑦3 Patentinhaber:  
Minnesota Mining and Mfg. Co., Saint Paul, Minn.,  
US

⑦4 Vertreter:  
derzeit kein Vertreter bestellt

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
BE, DE, FR, GB, IT, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:  
Vossen, John G.H.M., P.O.Box 33427, St.Paul, MN  
55133-3427, US

⑤4 Verfahren zur Selektivbestimmung von mikrobiellen Nukleotiden.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 37 86 279 T 2

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft die selektive Bestimmung von mikrobiellen Zellen in einer Probe, in der sowohl mikrobielle als auch nichtmikrobielle Zellen vermutet werden. Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung eines Assays, z.B. eines Biolumineszenzassays, zur Bestimmung von mikrobiellen Nukleotiden in einem Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins, der Anzahl oder Biomasse von mikrobiellen Zellen in einer Probe sowie das Inaktivieren oder Entfernen von nichtmikrobiellen Nukleotiden vor dem Erfassen von mikrobiellen Nukleotiden.

Hintergrund der Erfindung

Für die derzeitigen Biolumineszenzassays zum Bestimmen des Vorhandenseins, der Anzahl oder der Biomasse von mikrobiellen Zellen in einer Probe, die auch nichtmikrobielle Zellen enthalten kann, werden unerwünscht lange Behandlungszeiten benötigt. Diese Verfahren beruhen allgemein auf dem Erfassen von mikrobiellen Nukleotiden, wie dem Adenosintriphosphat (ATP). In einem typischen Assay können mikrobielle Zellen so behandelt werden, daß sie ihr ATP in Lösung bringen, so daß es mit den in dem Biolumineszenzassay verwendeten Reagenzien in Gegenwart von Magnesium und Sauerstoff unter Erzeugen von Photonen reagieren kann. Zu diesen Reagenzien gehören das Enzym Leuchtkeferluciferase und Luciferin als Substrat. Diese Photonen können erfaßt werden, und ihre Anzahl korreliert mit der Menge des ATP und daher mit der Anzahl oder Masse der ursprünglich vorhandenen Zellen. Siehe allgemein die US-Paten 3 745 090, 3 971 703, 4 014 745, 4 264 727, 4 303 752 und 4 501 813 und Leach, J. Appl. Biochem. 3, 473-517 (1981).

Die Behandlungszeiten sind unerwünscht lang, weil zunächst dafür gesorgt werden muß, daß in der Probe etwa vorhandene nichtnukleotid Zellen von den Nukleotiden des Assays entfernt werden. In der US-PS 3 745 090 wird vorgeschlagen, nichtmikrobielles ATP wie folgt zu entfernen: Die Probe wird zum spezifischen Freisetzen von ATP aus nichtmikrobiellen Zellen veranlaßt; das freigesetzte ATP wird durch Zusatz eines "ATP-hydrolysierenden Enzyms", z.B. einer ATPase oder häufiger einer Apyrase, die beide Hydrolasen sind, hydrolysiert oder "inaktiviert", und dann wird das Enzym inaktiviert oder zerstört, so daß es später von den mikrobiellen Zellen freigesetzte Zellen nicht beeinflusst. Dann wird das mikrobielle ATP freigesetzt und durch ein Biolumineszenzassay erfaßt.

In der US-PS 3 745 090 werden verschiedene Maßnahmen zum Inaktivieren oder Zerstören der Apyraseaktivität vorgeschlagen. Durch eine der dort vorgeschlagenen Maßnahmen werden alle Proteine der Probe (einschließlich der Enzyme) unspezifisch und unumkehrbar zerstört, z.B. durch Wärme- oder Säurebehandlung. Derartige Maßnahmen sind nicht einfach durchzuführen und häufig gefährlich und sind radikal, weil sie sehr wahrscheinlich auch mikrobielle Zellen zerstören und dadurch die Empfindlichkeit und Genauigkeit des Assays beeinträchtigen.

In der genannten Patentschrift wird auch die Verwendung von "Enzyminhibitoren" vorgeschlagen, doch sind bisher offenbar keine Inhibitoren bekannt, die ein ATP-hydrolysierendes Enzym, wie Apyrase, inhibieren können und z.B. hinsichtlich der Reaktionspartner, der Reaktionen und/oder der Ergebnisse eines darauffolgenden Biolumineszenzassays für die Verwendung in derartigen Verfahren geeignet sind.

Infolgedessen hat man trotz der in der US-PS 3 745 090 vorgeschlagenen Maßnahmen in technischen Verfahren den potentiellen Einfluß des gewöhnlich als Hydrolase verwendeten Enzyms Apyrase auf das mikrobielle ATP einfach dadurch unterdrückt, daß die Apyrase in niedrigen Konzentrationen verwendet wird, wie es in der US-PS 4 303 752 vorgeschlagen wird. Bei diesen niedrigen Konzentrationen braucht die Apyrase zum Inaktivieren des nichtmikrobiellen ATP entsprechend mehr Zeit. Nach dem vollständigen Inaktivieren des nichtmikrobiellen ATP kann dann das mikrobielle ATP freigesetzt und einem Assay unterworfen werden, obwohl ein Teil dieses ATP in dem Verfahren durch die noch vorhandene und noch aktive Apyrase inaktiviert wird.

Daher ist bei einer gegebenen Anwendung die optimale Menge der verwendeten Apyrase im allgemeinen jene Menge, mit der die nichtmikrobiellen Nukleotide in der kürzestmöglichen Zeit inaktiviert werden können, mit der aber doch noch ein Erfassen von mikrobiellem ATP möglich ist. Infolgedessen sind die Apyrasekonzentrationen im allgemeinen sehr niedrig und daher in dem Gesamtverfahren das Inaktivieren des nichtmikrobiellen ATP der am längsten dauernde Schritt. In zahlreichen der im Handel erhältlichen Biolumineszenzassays zum Erfassen von Mikroben werden zum vollständigen Inaktivieren des nichtmikrobiellen ATP durch Apyrase Zeiträume von etwa 10 bis 60 Minuten benötigt. Man kann dies mit den anderen Schritten eines typischen Assays vergleichen, z.B. mit dem Hinzufügen und Mischen von Reagenzien, dem Freisetzen von mikrobiellem ATP und dem Erzeugen und Zählen von Photonen, was gewöhnlich in Zeiträumen in der Größenordnung von Minuten oder sogar von Sekunden erfolgt und in automatischen Verfahren durchgeführt wird, die

für diese Assays spezifisch sind. In zahlreichen Anwendungen, z.B. bei der Reihenuntersuchung von zahlreichen Proben, wäre es sehr vorteilhaft, wenn die nichtmikrobiellen Nukleotide in kürzerer Zeit inaktiviert werden könnten und dieser Schritt daher in automatische Assayverfahren aufgenommen werden könnte.

Somit ist für das schnelle Inaktivieren von nichtmikrobiellen Nukleotiden ein Verfahren erwünscht, dessen Wirkungen schnell und wirksam derart unterdrückt werden können, daß sie das darauffolgende Assay auf mikrobielle Nukleotide nicht beeinträchtigen.

#### Angabe der Erfindung

Die Erfindung schafft ein Verfahren zum selektiven Festimmen von mikrobiellen Nukleotiden in einer Probe, von der vermutet wird, daß sie sowohl nichtmikrobielle als auch mikrobielle Zellen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- (1) nichtmikrobielle Nukleotide werden selektiv freigesetzt;
- (2) im wesentlichen alle freigesetzten nichtmikrobiellen Nukleotide werden durch die Verwendung einer wirksamen Menge eines inaktivierenden Enzyms inaktiviert, das keine Hydrolase ist und das durch einen spezifischen Inhibitor inhibierbar ist,
- (3) durch die Verwendung einer wirksamen Menge eines spezifischen Inhibitors wird das inaktivierende Enzym im wesentlichen vollständig inhibiert,

(4) mikrobielle Nukleotide werden selektiv freigesetzt und

(5) durch ein geeignetes Assay wird eine statistisch signifikante Menge der freigesetzten mikrobiellen Nukleotide erfaßt.

Man kann das Verfahren für das bloße Erfassen von mikrobiellen Zellen, aber auch zum Bestimmen der Anzahl oder Biomasse von mikrobiellen Zellen anwenden, z.B. durch Korrelieren der Menge der in einem Biolumineszenzassay erfaßten mikrobiellen Nukleotide mit der Konzentration der Nukleotide pro Zelle. Das erfindungsmäßige Verfahren ermöglicht die Verwendung von inaktivierenden Enzymen in so hohen Konzentrationen, daß das Inaktivieren in sehr kurzer Zeit durchgeführt werden und dadurch die für die Bestimmung erforderliche Gesamtzeit beträchtlich verkürzt werden kann. Das Verfahren kann den automatischen Assaytechniken, die derzeit in Biolumineszenzassays angewendet werden, leicht angepaßt werden und ist mit ihnen kompatibel.

Das Verfahren kann allgemein sogar angewendet werden, wenn ein Inhibitor gegen eine Reagens des Biolumineszenzassays selbst wirksam sein könnte, weil die Konzentration des wirksamen Inhibitors gegenüber dem Reagens für das Biolumineszenzassay so niedrig gehalten werden kann, daß die Aktivität des in dem Biolumineszenzassay verwendeten Reagens eine genügende Empfindlichkeit des Assays gewährleistet.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In dieser Schrift bezeichnet

der Ausdruck "Assay" jedes Assay zum Erfassen eines in einer lebenden Zelle enthaltenen oder von ihr erzeugten Nukleotids,

der Ausdruck "Nukleotid" jedes aus einem Pyrin, Pyrimidin oder Pyridin bestehende Nukleotid, das durch ein Assay direkt oder indirekt erfaßbar ist,

der Ausdruck "inaktivierendes Enzym" ein Enzym, das eine solche Wirkung hat, daß es ein Erfassen eines Nukleotids in einem Assay verhindert, in dem das Nukleotid sonst erfaßt werden könnte, d.h., ein Nukleotid "inaktiviert".

Sofern aus dem Zusammenhang nichts anderes hervorgeht, bezeichnen der Ausdruck "inhibieren" und davon abgeleitete Ausdrücke, wie "spezifischer Inhibitor", jede direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen einem Molekül, einer Verbindung, einem Reagens und/oder einer Bedingung und einem inaktivierenden Enzym, wobei diese Wechselwirkung insofern spezifisch ist, als alle oder die meisten anderen Proteine in der das Enzym enthaltenden Probe durch die Wechselwirkung nicht unumkehrbar zerstört werden, z.B. durch Wärme oder Säure, und die Wechselwirkung wenigstens teilweise dafür verantwortlich ist, daß die Aktivität des Enzyms derart und in einem solchen Grade vermindert wird, daß durch das Assay eine statistisch signifikante Menge von mikrobiellen Nukleotiden, wenn sie vorhanden ist, erfaßt werden kann.

Die hier verwendeten Ausdrücke "nichtmikrobiell" und "mikrobiell" schließen einander aus und bezeichnen Zellen, die Nukleotide selektiv freisetzen können, z.B. unter der Einwirkung von nichtionischen bzw. ionischen Tensiden, wie dies in der HS-PS 4 303 752 angegeben ist.



Mit "nichtmikrobiell" werden auch freie oder andere Nukleotide bezeichnet, die in einer von einer beliebigen Quelle stammenden Probe vorhanden sind und vor dem Freisetzen von in der Probe vorhandenen mikrobiellen Nukleotiden inaktiviert werden sollen. Die Ausdrücke "erstes Freisetzungsmittel" und "zweites Freisetzungsmittel" bezeichnen in dieser Schrift die zum Freisetzen von nichtmikrobiellen bzw. mikrobiellen Nukleotiden verwendeten Mittel und/oder Bedingungen, z.B. nichtionische und ionische Tenside, wie sie in der US-PS 4 303 752 angegeben sind, und die in der US-PS 3 745 090 angegebenen Mittel und Bedingungen.

Als "statistisch signifikant" wird in dieser Schrift ein erfaßter Spiegel von mikrobiellen Nukleotiden bezeichnet, der für den Zweck eines Assays geeignet ist. Beispielsweise ist für eine statistische Signifikanz für das bloße Erfassen von mikrobiellem ATP, z.B. bei der Sterilitätsprüfung, eine weniger strenge oder genaue Kombination von Assaybedingungen erforderlich als in einem Assay zur genauen zahlenmäßigen Erfassung von Mikroben. Im ersten Fall kann beispielsweise die Feststellung genügen, ob der erfaßbare Nukleotidenspiegel über oder unter einem vorherbestimmten Wert liegt. Dieser vorherbestimmte Wert kann von Fall zu Fall berechnet werden, wenn man die relativen Aktivitäten und Konzentrationen der Reaktionspartner und andere relevante Faktoren berücksichtigt, die die Empfindlichkeit oder Genauigkeit des Assays beeinflussen. Als "im wesentlichen genügend" wird hier eine Menge oder ein Grad bezeichnet, mit dem ein statistisch signifikantes Assay durchgeführt werden kann.

Für die Verwendung im Rahmen der Erfindung geeignete Inhibitoren müssen zwei grundlegende Kriterien genügen: (1) müssen sie für eine direkte oder indirekte

spezifische Wechselwirkung mit einem inaktivierenden Enzym geeignet sein, die mindestens teilweise zur Herabsetzung der Aktivität des Enzyms geeignet ist, und (2) müssen sie derart und in einem solchen Grade wirksam sein, daß eine statistisch signifikante Menge von mikrobiellen Nukleotiden, wenn sie vorhanden ist, durch ein Assay erfaßt werden kann.

Um dem ersten Kriterium zu genügen, ist der Inhibitor vorzugsweise ein Molekül, eine Verbindung, ein Reagens und/oder eine Bedingung, durch das bzw. die direkt oder indirekt eine Reaktion mit dem Enzym herbeigeführt werden kann.

Ein spezifisches Inhibieren von einigen Enzymen kann durch eine "Rückkopplungsinhibition" mit Hilfe der Produkte der durch das Enzym katalysierten Reaktion selbst erfolgen. Bei einem derartigen Enzym wird durch die Zugabe des betreffenden Produkts die fortgesetzte Aktivität des Enzyms inhibiert, im allgemeinen durch Anlagern des Produkts an eine essentielle (z.B. aktive oder allosterische) Stelle des Enzyms. Ferner können zahlreiche Enzyme durch Wechselwirkungen eines Moleküls, einer Verbindung, eines Reagens und/oder einer Bedingung mit einer oder mehreren bestimmten Gruppen spezifisch inhibiert werden, die in dem Enzym enthalten und irgendwie für die inaktivierende, d.h. katalytische Wirksamkeit des Enzyms verantwortlich sind. Zu den Gruppen, mit denen eine derartige Wechselwirkung erzielbar ist, gehören, ohne Einschränkung darauf, Amino-, Imidazol-, Guanidinyl-, Indol-, Thioether-, Disulfid-, Hydroxyl-, Phenol- und Carboxylgruppen.

Die Stelle oder die spezifische Gruppe oder Gruppen, die an der Wechselwirkung beteiligt ist bzw. sind, braucht oder brauchen sich nicht an der aktiven Stelle des

Enzyms zu befinden, und die Inhibition des inaktivierenden Enzyms kann umkehrbar oder unumkehrbar sein. Ferner kann der Inhibitor dadurch wirksam sein, daß er aus der Lösung oder von dem Enzym ein anderes Molekül oder eine andere Verbindung entfernt, die für die Aktivität des Enzyms wesentlich ist. Wenn beispielsweise ein bestimmtes Enzym für seine Wirksamkeit das Vorhandensein eines zweiwertigen Kations erfordert, kann das Enzym dadurch inaktiviert werden, daß durch Zusatz eines geeigneten Chelatbildners das Kation wirksam entfernt wird. In diesem und anderen Fällen wird dann der Inhibitor, hier der Chelatbildner, als ein indirekter Inhibitor für das Enzym angesehen.

In bevorzugten Inhibitoren ist eine optimale Kombination von Faktoren, wie der Spezifizität und Geschwindigkeit der durch sie bewirkten Inhibition des inaktivierenden Enzyms, der minimalen Störung (z.B. durch Abschreckung) des darauffolgenden Assays, sowie der Löslichkeit, des Preises, der Verfügbarkeit, der Sicherheit, Stabilität und Reinheit, vorhanden.

Bevorzugte Inhibitoren sind im Handel erhältlich und können unter zum Stand der Technik gehörenden Bedingungen verwendet werden. Im allgemeinen soll der Inhibitor hinsichtlich der Temperatur, des pH-Wertes usw. unter den für das Gesamtassay gewählten Bedingungen wirksam sein.

Eine bevorzugte Gruppe von Inhibitoren sind Reagenzien, insbesondere jene, die für die Enzyme der Sulfhydrylgruppe spezifisch sind. Einige dieser Reagenzien sind beispielsweise im CRC Handbook of Biochemistry, 2. Auflage (Sober), 1970, Tabelle C-139) angegeben. Die Spezifizität eines bestimmten Inhibitors für Sulfhydrylgruppen kann ferner durch Verfahren festgestellt werden, wie sie von Riordan u.a. in Methods Enzym, Band XXV, S. 449-464, angegeben sind.

Besonders bevorzugte Inhibitoren sind die "Blockier- und Markierenzyme", die von G.L. Kenyon und T.W. Bruce in Methods in Enzymol., Band XLVII, S. 407-430, beschrieben worden sind. Zu den bevorzugten unumkehrbaren Inhibitoren dieser Gruppen gehören ohne Einschränkung darauf das N-Ethylmaleimid, die organischen Quecksilberverbindungen, das Jodacetat und das Jodacetamid. Zu den bevorzugten umkehrbaren Inhibitoren gehören ohne Einschränkung darauf die Arylhalogenide, wie das 2,4-Dinitrofluorbenzol.

Damit ein Inhibitor dem zweiten Kriterium genügt, d.h. er die Durchführung eines statistisch signifikanten Assays gestattet, ist es nicht notwendig, daß der Inhibitor auf das Assay überhaupt keine Wirkung ausübt. Es ist nur notwendig, daß bei Vorhandensein einer geeigneten Kombination von Faktoren, wie den relativen Wirkungszeiten, Aktivitäten und Konzentrationen der beteiligten Reagenzien, die Erfassung von mikrobiellen Nukleotiden nur minimal gestört wird und nur so gering ist, daß trotz des Vorhandenseins des Inhibitors eine statistisch signifikante Menge von mikrobiellen Nukleotiden noch erfaßt werden kann. Tatsächlich bewirken bevorzugte Inhibitoren gemäß der Erfindung, z.B. jene, die für Sulfhydrylgruppen spezifisch sind, sehr wahrscheinlich ein Inhibieren von sulfhydrylempfindlichen Enzymen, wie Leuchtkeferluciferase, die in Biolumineszenzassays verwendet werden. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird Luciferase nur in einer zulässigen Menge inhibiert.

Die Wirkung eines bestimmten Inhibitors in einem Biolumineszenzassay kann auf verschiedene Weise experimentell bestimmt werden, z.B. durch Erzeugen und Assayproben, die den Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, und durch einen Vergleich derselben mit Kontrollproben.

Wenn für eine bestimmte Anwendung die gewünschte Empfindlichkeit des Assays mit einer InhibitorKonzentration erzielt werden kann, die zum Inhibieren des inaktivierenden Enzyms genügt, kann die Verwendung dieses Inhibitors in dem erfindungsgemäßen Verfahren ins Auge gefaßt werden.

Daher ist die häufig als Hydrolase verwendete Apyrase für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht geeignet, weil es offenbar nicht möglich ist, einen Inhibitor anzugeben, der diesem zweiten Kriterium genügt. Es hat sich gezeigt, daß die Apyrase z.B. durch Reagenzien der Sulfhydrylgruppe nicht inhibiert wird. Siehe z.B. Valenzuela u.a., Biochem. J., 133:755-763 (1973).

Deshalb sind im Rahmen der Erfindung als inaktivierende Enzyme jene Enzyme verwendbar, die keine Hydrolasen sind. Diese Enzyme müssen ebenfalls zwei grundlegenden Kriterien genügen: (1) müssen sie derart wirksam sein, daß sie ein Erfassen der nichtmikrobiellen Nukleotide in einem Assay verhindern, in dem diese Nukleotide sonst erfaßt werden könnten; (2) müssen sie geeignet sein, eine spezifische Wechselwirkung einzugehen, durch die diese Fähigkeit im wesentlichen verhindert oder inhibiert wird.

Dem ersten Kriterium genügende Enzyme sind bekannt und umfassen sowohl Enzyme, die direkt auf Nukleotide als Substrate einwirken, z.B. indem sie ein anderes Molekül phosphorylieren, als auch Enzyme, die in gekoppelten endothermen Reaktionen auf andere Substrate einwirken, bei denen aber zum Durchführen der Reaktion ein Nukleotid, z.B. als Quelle von Energie oder von reduzierend wirkenden Äquivalenten erforderlich ist.

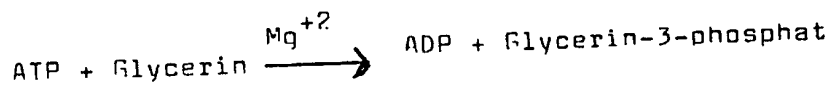
Die Enzyme werden am besten gemäß der Klassifikation klassifiziert, die von dem Nomenklaturausschuß der International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature (1978), empfohlen worden ist. Gemäß dieser Enzymklassifikation ("EC") gehören zu den im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten nukleotidinaktivierenden Enzymen bestimmte Enzyme der Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Lyasen, Isomerasen und Linasen.

Es werden jene inaktivierenden Enzyme bevorzugt, die eine starke Aktivität zum Inaktivieren von Nukleotiden und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer spezifischen Inhibition haben. Ferner werden Enzyme bevorzugt, die exotherme Reaktionen katalysieren, z.B. Reaktionen, in denen kein Gleichgewichtszustand zwischen dem Nukleotid und seinem Produkt herzustellen ist, sondern das Nukleotid vollständig umgewandelt wird. Ferner werden Enzyme bevorzugt, die wegen ihrer Kosten, Verfügbarkeit, Sicherheit, Löslichkeit, Beständigkeit und Reinheit für eine reproduzierbare Verwendung in routinemäßig durchgeführten Analysen in einem weiten Anwendungsbereich und mit geringen Kosten verwendbar sind.

Beispiele von bevorzugten inaktivierenden Enzymen fallen in folgende Kategorien: Transferasen (Gruppe 2 der EC). Besonders bevorzugt werden die (gewöhnlich als Kinasen bekannten) Phosphotransferasen (Gruppe 2.7 der EC). Hinsichtlich ihrer Aktivität werden die Enzyme der Gruppe 2.7 voneinander in erster Linie durch die entsprechende Akzeptorgruppe unterschieden. Durch die Phosphotransferasen der Gruppe 2.7.1 wird eine Phosphatgruppe an eine Alkoholgruppe eines Akzeptormoleküls übertragen, durch jene der Gruppe 2.7.2 an eine Carboxylgruppe, durch jene der Gruppe 2.7.3 an eine

stickstoffhaltige Gruppe und durch jene der Gruppe 2.7.4 an eine andere Phosphatgruppe, wie dies bei der Adenylatkinase der Fall ist. Die durch Enzyme der ersten Gruppe (2.7.1) katalysierten Reaktionen sind im allgemeinen unumkehrbar; die durch die anderen drei Gruppen katalysierten dagegen im allgemeinen umkehrbar. In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Umkehrbarkeit der Reaktion im allgemeinen kein kritischer Faktor.

Bevorzugte Phosphotransferasen sind die Hexokinase, die Acetatkinase und chemische Modifikationen derselben sowie die in der unter EC 2.7.1.30 klassifizierten, die gewöhnlich als Glycerokinasen bezeichnet werden (und auch als ATP:Glycerin-3-phosphotransferasen bekannt sind). Glycerokinasen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem ATP-Donormolekül auf ein Glycerinakzeptormolekül nach der Gleichung



Verschiedene Glycerokinasen kommen in der Natur vor. Jede von ihnen wandelt ein Glycerin in Glycerin-3-phosphat um. Dies ist eine Form, die in verschiedene Synthesen eintreten kann, z.B. in jene, die zu Glykogen, Triacylglycerinen usw. führen.

Geeignete Glycerokinasen sind im Handel erhältlich, z.B. von der Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, von der die mikrobiellen Enzyme erhältlich sind, die von *Candida mycoderma*, *Candida utilis* und *Escherichia coli* abgeleitet sind. Glycerokinase kann auch von nichtmikrobiellen Quellen, z.B. von Säugetieren gewonnen werden. Glycerokinasen von verschiedenen Quellen unterscheiden sich nicht nur hin-

sichtlich ihrer Inaktivierungsaktivität, sondern z.B. auch hinsichtlich ihrer Inhibierbarkeit durch verschiedene Inhibitoren. Beispielsweise sind von Säugetieren gewonnene Glycerokinasen im allgemeinen durch Jodacetamid stärker inhibierbar, während die von bakteriellen Quellen gewonnenen durch organische Quecksilberverbindungen stärker inhibierbar sind.

Die physikalische Form oder die Aktivität des inaktivierenden Enzyms, (das z.B. in Form von kristallinen Kristallsuspensionen, gefriergetrockneten Pulvern oder Lösungen verwendet werden kann) ist nicht kritisch, wenn sie in ihrer Form und Aktivität für die Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind.

Erforderlichenfalls wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren jedes inaktivierende Enzym im allgemeinen zusammen mit einer zugesetzten, d.h. exogenen Menge des entsprechenden Akzeptormoleküls verwendet. Man kann auch endogene Akzeptormoleküle verwenden. Wenn anzunehmen ist, daß die Probe das Akzeptormolekül in einer genügenden Menge enthält, kann diese berücksichtigt werden, doch wird ein Zusatz von Akzeptormolekülen in einer solchen Konzentration bevorzugt, daß eine genügende Aktivität des inaktivierenden Enzyms gewährleistet ist.

Das bevorzugte Akzeptormolekül ist beispielsweise für Glycerokinase das Glycerin, das von vielen Lieferanten ohne weiteres billig erhältlich ist. Die bevorzugte Konzentration des Glycerins liegt im allgemeinen zwischen etwa 1 mM und etwa 30 mM, insbesondere zwischen etwa 1 mM und etwa 10 mM. Durch die Glycerokinase werden jedoch auch andere Akzeptormoleküle phosphoryliert, wie das Dihydroxyaceton, 1-Glyceraldehyd, 1-Glyceraldehydacetat usw.



Jedes inaktivierende Enzym wird ferner vorzugsweise unter solchen Bedingungen und mit Kofaktoren verwendet, die für seine Wirksamkeit erforderlich sind, sofern diese Bedingungen und/oder Kofaktoren das danach durchgeführte Assay nicht merklich beeinträchtigen. Beispielsweise wird die bevorzugte Glycerokinase im allgemeinen in Gegenwart von zweiwertigen Metallkationen, wie  $Mg^{+2}$ , verwendet. Einige Glycerokinasen werden durch  $Mg^{+2}$  oder andere, ähnliche Kationen angeregt, während derartige Kationen bei anderen Glycerokinasen absolut notwendig sind. Die für die Verwendung der Glycerokinase optimale Konzentration von  $Mg^{+2}$  hängt teilweise auch von anderen Faktoren ab, z.B. von der ATP-Konzentration, liegt aber im allgemeinen zwischen 1 mM und 10 mM und vorzugsweise zwischen 3 mM und 7 mM.

Ferner wird das inaktivierende Enzym in einem pH-Wertbereich verwendet, in dem das Enzym wirksam ist. Beispielsweise liegt bei Glycerokinase der pH-Wert vorzugsweise zwischen 6 und 10, insbesondere zwischen 7 und 8. Andere Hilfsstoffe und Bedingungen für jedes inaktivierende Enzym sind in der Literatur gut beschrieben und sind im allgemeinen im Handel erhältlich.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird von einer Probe ausgenommen, die vermutlich sowohl nichtmikrobielle als auch mikrobielle Zellen enthält. Da nichtmikrobielle Zellen im allgemeinen mehr Nukleotide pro Zelle enthalten als mikrobielle Zellen, ist es nicht notwendig, daß die Probe nichtmikrobielle Zellen in einer größeren Anzahl enthält als mikrobielle Zellen. Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist geboten, wenn die Probe so viele z.B. natürlich vorkommende oder verunreinigende Nukleotide enthält oder enthalten könnte, und zwar entweder in Lösung oder in nicht-mikrobiellen Zellen, daß die Bestimmung der mikrobiellen Zellen verfälscht werden oder unzuverlässig sein könnte.

Zu den typischen Proben, auf die das erfindungsgemäße Verfahren angewendet werden kann, gehören Körperflüssigkeiten, wie Urin oder Blut, Molkeerprodukte, zubereitete Nahrungsmittel, Getränke und Säfte, Kosmetika und Pharmazeutika, der Umgebung entnommene Proben sowie Proben für Forschungszwecke, z.B. zum Testen von Antibiotika. Die Probe wird nach bekannten Techniken gewonnen, manipuliert und präpariert. Z.B. kann man eine Probe durch Vorinkubieren oder Filtrieren anreichern oder sie löslichmachen oder enttrüben oder eine übermäßige Färbung oder Viskosität vermeiden. Vorzugsweise werden die Proben nach bekannten Verfahren als Einzelzellen in Suspension oder als einzelne oder doppelte Lagen von Zellen hergestellt.

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden selektiv Nukleotide von nichtmikrobiellen Zellen freigesetzt. Dazu verwendet man vorzugsweise ein erstes Freisetzungsmittel, das die nichtmikrobiellen Zellen beispielsweise auflöst oder durchlässig macht. Das erste Freisetzungsmittel kann jede Verbindung oder Bedingung sein, die eine selektive Freisetzung von nichtmikrobiellen Nukleotiden bewirkt.

Das erste Freisetzungsmittel ist vorzugsweise ein nichtionisches Tensid, z.B. ein ethoxyliertes Alkylphenol oder ein Fettsäurepolyglykolether, wie sie in der US-PS 4 303 752 beschrieben sind.

Das erste Freisetzungsmittel wird der Probenlösung in einer wirksamen Konzentration zugesetzt, die zum Freisetzen im wesentlichen aller nichtmikrobiellen Nukleotide innerhalb eines gewünschten Zeitraums genügt. Bei Verwendung eines bevorzugten ersten Freisetzungsmittels wird die Membran von nichtmikrobiellen Zellen durchlässig, so daß Nukleotide

schnell und frei aus den Zellen in die extrazelluläre Umgebung diffundieren können. Bei Verwendung eines bevorzugten ersten Freisetzungsmittels werden die meisten Nukleotide aus nichtmikrobiellen Zellen innerhalb von 15 bis 60 s freigesetzt, wenn nicht mehr als etwa 10 Millionen nichtmikrobielle Zellen pro ml vorhanden sind. Da die nichtmikrobiellen Zellen im allgemeinen nur einen kleinen Prozentsatz des Volumens der Probe einnehmen, ist die Mehrzahl der Nukleotide außerhalb der Zellen vorhanden, nachdem die Zellen durchlässig geworden sind. Gegebenenfalls kann die Probe bei Zimmertemperatur oder jeder anderen geeigneten Temperatur, vorzugsweise jedoch bei einer Temperatur zwischen +2 und +40°C, z.B. bis zu etwa 60 min inkubiert werden, damit eine maximale Freisetzung der nichtmikrobiellen Nukleotide gewährleistet ist.

In einem weiteren Schritt werden im wesentlichen alle freigesetzten nichtmikrobiellen Nukleotide durch ein inaktivierendes Enzym inaktiviert, das mit einem spezifischen Inhibitor inhibierbar ist. Das inaktivierende Enzym kann der Probe vor, bei und/oder nach der Zugabe des ersten Freisetzungsmittels zugesetzt werden. Der Zeitpunkt der Zugabe des inaktivierenden Enzyms ist im allgemeinen nicht kritisch, weil unabhängig von dem Zeitpunkt der Zugabe des Enzyms dessen schwache inaktivierende Wirkung erst zur Geltung kommt, nachdem Nukleotide freigesetzt worden sind. Aus Gründen der Bequemlichkeit und Geschwindigkeit wird das Enzym vorzugsweise gleichzeitig mit dem ersten Freisetzungsmittel zugesetzt.

Die Konzentration des Enzyms ist nicht so kritisch wie in zahlreichen derzeit mit Pyrase durchgeführten Assayverfahren, und zwar deswegen, weil die erfindungsgemäßen

Enzyme im wesentlichen beliebig und unabhängig von ihrer Konzentration inhibiert werden können. Die tatsächliche Konzentration des Enzyms ist auch von der Art des Enzyms und seiner Quelle, von seiner Aktivität, von der vermuteten Konzentration der nichtmikrobiellen Nukleotide usw. abhängig, wie es sich für den Fachmann versteht.

Im allgemeinen sind die bevorzugten inaktivierenden Enzyme gemäß der Erfindung in einer wirksamen Konzentration vorhanden, mit der die Nukleotide in der vermuteten Konzentration in der gewünschten Zeit inaktiviert werden können. Diese Konzentration kann durch Berechnung oder vorzugsweise durch einfache Versuche bestimmt werden. Etwa verwendete Akzeptormoleküle und andere Verbindungen, Kofaktoren oder für die Wirksamkeit des Enzyms erforderliche andere Moleküle werden vorzugsweise zusammen mit dem inaktivierenden Enzym zugesetzt.

Die Probe wird vorzugsweise in Bewegung solange inkubiert, daß das inaktivierende Enzym im wesentlichen alle aus den nichtmikrobiellen Zellen freigesetzten Nukleotide inaktivieren kann. Dank der notwendigerweise niedrigen Konzentration des zum Inaktivieren von nichtmikrobiellen Nukleotiden verwendeten Enzyms, d.h. der Apyrase, muß etwa 10 bis 60 min inkubiert werden; diese Zeit ist zum großen Teil von der Art der Probe abhängig. In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das inaktivierende Enzym in Konzentrationen zugesetzt werden, mit denen diese Inkubationszeiten entsprechend verkürzt werden können, im allgemeinen mindestens auf die Hälfte und vorzugsweise auf ein Viertel oder einen noch kürzeren Teil der Zeit, die in einem vergleichbaren üblichen Verfahren benötigt wird, in dem mit niedrigen Konzentrationen von Apyrase gearbeitet wird. Daher beträgt in dem erfindungs-

gemäßem Verfahren die Inkubationszeit vorzugsweise 10 min oder weniger, insbesondere 5 min oder weniger. Die richtige Inkubationszeit kann vor allem unter Berücksichtigung der vermuteten Konzentration der nichtmikrobiellen Nukleotide und der relativen Konzentrationen und Aktivitäten des inaktivierenden Enzyms und des Inhibitors bestimmt werden. Für den Fachmann versteht es sich, daß bei geeigneter Abstimmung dieser Faktoren in kurzer Zeit ein solcher Grad der Inaktivierung erzielt werden kann, daß danach eine Freisetzung und Bestimmung von mikrobiellen Nukleotiden möglich sind.

In einem weiteren Schritt wird mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors das inaktivierende Enzym im wesentlichen vollständig inhibiert. Der Inhibitor wird der das inaktivierende Enzym und die nichtmikrobiellen Nukleotide enthaltenden Lösung vorzugsweise direkt und in solchen Mengen, zu solchen Zeitpunkten und unter solchen Bedingungen zugesetzt, daß das Inhibieren unter Bewegung in einer kurzen Zeit von etwa 50 s oder weniger durchgeführt werden kann.

Die Menge, in der der Inhibitor zugesetzt wird, ist von Faktoren wie der Art, Quelle, Konzentration und Empfindlichkeit des inaktivierenden Enzyms und der Konzentration und Empfindlichkeit von in dem nachfolgenden Assay verwendeten Reagenzien abhängig. Die Konzentration des Inhibitors ist nicht kritisch, doch wird er vorzugsweise in einer wirksamen Konzentration verwendet, mit der das inaktivierende Enzym im wesentlichen vollständig inhibiert wird, bei der aber eine statistisch signifikante Erfassung von mikrobiellen Nukleotiden vorgenommen werden kann. Die Konzentration, in der der Inhibitor tatsächlich verwendet wird, ist in beträchtlichem Grade von dem gewählten Inhibitor und dem verwendeten inaktivierenden Enzym abhängig und kann vom Fachmann durch einfache Versuche ermittelt werden.

Genebenenfalls können nach dem Inhibieren des inaktivierenden Enzyms weitere Maßnahmen getroffen werden, insbesondere wenn der spezifische Inhibitor in einer höheren Konzentration als das Enzym vorhanden ist und auch auf andere für das Assay zuzusetzenden Reagenzien inhibierend wirkt. Da diese Assayreagenzien gewöhnlich zu den teureren in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Substanzen gehören und gewöhnlich in Materialsätzen in vorherbestimmten Mengen im Handel erhältlich sind, kann es unter manchen Umständen ratsam sein, zunächst einige oder alle der von überschüssigem Inhibitor auf die Reagenzien ausgeübten Wirkungen zu unterdrücken, bevor die Reagenzien selbst inhibiert werden. Dadurch kann gewährleistet werden, daß eine wirksame und vorzugsweise bekannte Menge von Assayreagenzien wirksam bleibt.

Eine dieser möglichen Maßnahmen besteht darin, daß der Lösung eine Verbindung zugesetzt wird, die selbst fähig ist, mit überschüssigem Inhibitor zu reagieren und ihn dadurch zu binden. Wenn beispielsweise der Inhibitor eine Reagens mit einer Sulfhydrylgruppe ist, kann ein Aminosäurencystein zugesetzt werden, das eine Sulfhydrylgruppe enthält, die mit einem sulfhydrylemfindlichen Assayreagens um den Inhibitor konkurriert. Durch einen Vergleich der Bindungskinetik zwischen dem Inhibitor und dem Cystein einerseits und dem Assayreagens andererseits kann der Fachmann ohne weiteres die Konzentration ermitteln, in der das Cystein erforderlich ist, damit das nichtinhibierte Assayreagens in der gewünschten Konzentration vorliegt.

Vorzugsweise wird der Inhibitor vor dem Freisetzen der mikrobiellen Nukleotide zugesetzt oder wenigstens

bevor das inaktivierende Enzym soviel mikrobielle Nukleotide inaktivieren kann, daß eine statistisch signifikante Erfassung derselben nicht mehr möglich wäre. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird der Inhibitor vorzugsweise gleichzeitig mit dem zweiten Freisetzungsmittel zugesetzt, d.h. in dem Zeitpunkt, in dem das Freisetzen von Nukleotiden von den mikrobiellen Zellen beginnt. Bei einer Steuerung verschiedener Faktoren, z.B. der Konzentration und Art des inaktivierenden Enzyms, des Inhibitors und des Freisetzungsmittels, relativ zueinander kann der Inhibitor das inaktivierende Enzym innerhalb von Sekunden wirksam inhibieren. Da auch das Freisetzen von mikrobiellen Nukleotiden häufig in Sekunden erfolgt, kann der Fachmann den Inhibitor und das Freisetzungsmittel ohne weiteres so verwenden, daß durch die Enzymaktivität im wesentlichen alle nichtmikrobiellen Nukleotide und vielleicht auch einige der mikrobiellen Nukleotide inaktiviert werden, aber eine statistisch signifikante Menge der mikrobiellen Nukleotide verbleibt.

In einem weiteren Schritt werden die mikrobiellen Nukleotide selektiv freigesetzt. Dies kann gleichzeitig mit der Zugabe des Inhibitors oder danach bewirkt werden, indem ein zweites Freisetzungsmittel in einer wirksamen Menge zugesetzt wird.

Als zweite Freisetzungsmittel werden ionische Tenside verwendet, wie sie in der US-PS 4 303 752 angegeben sind. Ein besonders bevorzugtes zweites Freisetzungsmittel ist ein Gemisch eines quaternären Ammoniumsalzes und eines ethoxylierten Amins, ethoxylierten Diamins, Fettsäurepolyethylenglykolesters oder eines ethoxylierten Amids. Bei einer Verwendung von bevorzugten zweiten Freisetzungsmitteln in geeigneten Konzentrationen z.B. in einer Größenordnung

von 0,05 bis 0,5 Vol.-%, werden die Zellmembran und die Zellwand von Mikroben im allgemeinen so durchlässig, daß Nukleotide schnell, in einer Mischzeit von etwa 15 bis 60 s, freigesetzt werden können.

In einem weiteren Schritt wird in einem geeigneten Assay, z.B. einem Biolumineszenz- oder Chemilumineszenzassay, eine statistisch sinnifikante Menge der freigesetzten mikrobiellen Nukleotide erfaßt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren können aber auch andere Assays verwendet werden, zu denen die in der Technik bekannten photometrischen und spektrophotometrischen Assays, Fluoreszenzassays und andere in der Technik bekannte Assays verwendet werden können, mit denen die vorhandenen mikrobiellen Nukleotide direkt oder indirekt erfassbar sind.

Vorzugsweise wird ein Biolumineszenzassay verwendet. In einem typischen Assay wird eine Aliquote von z.B. 50 Mikrolitern bis 1,0 ml der Probenlösung mit dem bzw. den geeigneten Biolumineszenzreagens oder -reagenzien, z.B. dem aus Leuchtkäferluciferase und Luciferin bestehenden Reagens für ATP gemischt, und wird die erhaltene Lichtemission in an sich bekannter Weise photometrisch gemessen.

Als Reagenzien für die Erfassung von ATP durch Biolumineszenz werden Luciferase und Luciferin bevorzugt. Ein typisches handelsübliches Reagens ("Lumit PM", Lumac/3M, Niederlande) enthält das gereinigte Enzym Luciferase von Leuchtkäfern, ferner synthetisches D-Luciferin als Kofaktor für das Enzym, einen Stabilisator, wie Rinderserumalbumin, und eine Verbindung zum Schutz der Sulfhydrylgruppen der Luciferase während der Lagerung, z.B. Dithiothreitol. Dieses Reagens wird gewöhnlich gefriergetrocknet und wird in einer opaken Ampulle unter einem Vakuum geliefert. Das Reagens kann in einer Pufferlösung suspendiert und nach den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.



Das erfindungsgemäße Verfahren wird gewöhnlich in einer gepufferten Lösung durchgeführt, und jeder Inhaltsstoff wird entweder in derselben Pufferlösung oder in einer anderen Lösung erzeugt, die die Wirksamkeit der gepufferten Lösung nicht beeinträchtigt. Beispielsweise ist für diese Zwecke eine handelsübliche Pufferlösung mit 25mM Hepes und 7,5 mM  $MgSO_4$  und dem pH-Wert 7,75 ("Lumit Buffer", Lumac/3M) besonders gut geeignet.

Das inaktivierende Enzym und der ihm entsprechende spezifische Inhibitor, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, können auf eine Weise erzeugt und verpackt werden, die ihre Verwendung bei einer raschen automatischen Anwendung des Verfahrens auf eine große Anzahl von Proben erleichtert. Beispielsweise können das Enzym und der Inhibitor z.B. vorherbestimmten Mengen einzeln z.B. in Ampullen, verpackt werden, und zwar gegebenenfalls zusammen mit anderen Substanzen für ein Assay und/oder mit Hilfsstoffen, wie Konservierungsmitteln. Diese vorherbestimmten Mengen können dann mit Materialsätzen zur selektiven Bestimmung von mikrobiellen Nukleotiden zusammen mit Anleitungen für die Verdünnung oder Verwendung dieser Stoffe abgegeben werden.

Andere für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Reagenzien sind im Handel erhältlich und können in dem Fachmann bekannter Weise erzeugt und verwendet werden.

Zu den zum Erfassen von in einer Biolumineszenz- oder Chemilumineszenzreaktion erzeugten Photonen geeigneten Apparaturen gehören verschiedene im Handel erhältliche photometrische Instrumente, u.a. Instrumente mit Photodioden und Photonenzählinstrumente. In einem Photonenzählinstrument, z.B. einem im Handel von Lumac/3M erhältlichen "Biocounter" wird das in einer Biolumineszenzreaktion erzeugte Licht über

eine feste Zeitspanne von z.B. 10, 30 oder 60 s integriert.

Ideal ist es, wenn das photometrische Instrument eine schnell und automatisch arbeitende Pipettiereinrichtung umfaßt, die eine genauere Steuerung der Zeit, Genauigkeit und Bedingungen der in dem Assay durchzuführenden Schritte ermöglicht.

Der bei der bevorzugten photometrischen Erfassung von Photonen erhaltene Meßwert, z.B. in von einem Photonenzählinstrument ermittelten relativen Lichteinheiten (RLE), kann mit der Menge der mikrobiellen Nukleotide korreliert werden. Diese Bestimmung kann auf verschiedene in der Technik bekannte Weisen durchgeführt werden, z.B. in einem zur Reihenuntersuchung durchgeführten Assay auf Verunreinigungen oder Sterilität durch einen Vergleich mit einem vorherbestimmten Schwellenwert, oder er kann mit der Anzahl oder der Masse der vorhandenen Zellen korreliert werden. Beispielsweise kann nach einem üblichen Plattenzählverfahren eine Standardkurve generiert und zum Korrelieren der Zahl der koloniehildenden Einheiten (CFU/ml) mit den RLE-Werten verwendet werden.

Die nachstehenden Ausführungsbeispiele sollen den Umfang der Erfindung erläutern. In allen Beispielen bedeutet ein "+", daß ein bestimmter Inhaltsstoff in der angegebenen Konzentration vorhanden war, und ein "-", daß er nicht vorhanden war. Soweit nichts anderes angegeben ist, sind alle in den Tabellen angegebenen Konzentrationen Endkonzentrationen in der Probe vor der Zugabe von Biolumineszenzreagenzien.

Jede Probe wurde nach genormten Biolumineszenzverfahren in einem Photonenzählinstrument (Biocounter M202 M2010, Lumac/3M) analysiert. In diesen Verfahren wird eine

Aliquots von 50 oder 100 Mikrolitern der zu analysierenden Probe in eine Küvette gegeben, die in das Zählinstrument eingesetzt wird, in dem 100 Mikroliter der Biolumineszenzreagenzien (Lumit PM) zugegeben werden. Gleichzeitig mißt das Zählinstrument mit einer Integrationszeit von 10 s das emittierte Licht, das in relativen Lichteinheiten" (RLE-Werten)" angezeigt wird.

#### BEISPIEL 1

Die Fähigkeit des Enzyms Glycerokinase und die Wirksamkeit der Chlormercuribenzoessäure ("PCMB"), einer organischen Quecksilberverbindung, als Inhibitor für dieses Enzym wurden zur Bewertung ihrer Eignung in einem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt.

##### Substanzen:

- Pufferlösung: Lumit Puffer, Lumac/3M, Niederlande, 25 mM Hepes, 7,5 mM  $MgSO_4$  (pH-Wert 7,75)
- ATP: Lumac/3M, Inhalt einer Ampulle (10 Mikrogramm) mit Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit Pufferlösung im Verhältnis von 1:10 weiter verdünnt.
- Magnesiumsulfat: Merck GmbH, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland, 500 mM in bidestilliertem Wasser
- Glycerin als Akzentormolekül: Merck, 300 mM in bidestilliertem Wasser
- Glycerokinase als Enzym: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 80 E/mg, 2 mg/ml in 3,2 M Ammoniumsulfat, Endkonzentration 1,6 E/ml
- Inhibitor: o-Chlormercuribenzoessäure (PCMB), Sigma, 100 mM in 25 mM Hepes, 0,2 M NaOH (Lösung A); diese Lösung wurde mit Pufferlösung derart weiter verdünnt, daß PCMB-Konzentrationen von 10 mM (Lösung B) bzw. 1,0 mM (Lösung C) erhalten wurden

- Luciferase-Luciferin: Lumit PM, Lumac/3M; der Inhalt einer Ampulle wurde mit Pufferlösung auf 7,0 ml aufgefüllt

Protokoll: Es wurden folgende Proben hergestellt:

Probe	Puffer-Lösung (ul)	ATP (ul)	MgSO <sub>4</sub> (ul)	Glycerin (ul)	Glycero-kinase (ul)	PCMB (ul, Lösung)	
1	900	50	10	10	10	20	A
2	910	50	10	10	10	10	A
3	870	50	10	10	10	50	P
4	910	50	10	10	10	10	P
5	870	50	10	10	10	50	C
6	910	50	10	10	10	10	C
7	920	50	10	10	10	0	-

Assay:

Den Proben wurde als letztes Glycerin zugesetzt, um die Wirkung des Enzyms einzuleiten. Vor dem Zusatz des Glycerins wurde von allen Proben eine Aliquote von 50 Mikrolitern genommen. Die ATP-Spiegel in diesen Aliquoten (in RLE-Werten) wurden als Nullzeitwerte bestimmt. Dann wurde den Gemischen Glycerin zugesetzt und wurden nach 5, 10 und 50 min weitere Aliquoten von 50 Mikrolitern genommen. In allen Aliquoten wurde ATP in der beschriebenen Weise durch Biolumineszenzverfahren bestimmt.

Ergebnisse:

TABELLE 1

Probe	Relative Lichteinheiten (RLE-Werte)					PCMB(mM)
	0 min	5 min	10 min	15 min		
1	7977	7245	7905	7568	2	
2	8802	9437	9329	9591	1	
3	9041	8800	8617	9028	0,5	
4	8499	9560	9253	9421	0,1	
5	9003	9048	8727	9049	0,05	
6	9065	9121	8982	3913	0,01	
7	6572	8	13	9	0	

Schlußfolgerung: Aus der Tabelle 1 ergibt sich, daß die Glycerokinase ein wirksames inaktivierendes Enzym für ATP ist (siehe Probe 7) und daß die PCMP ein sehr wirksamer Inhibitor für die Glycerokinase ist (weil in den Proben 1 bis 6 ein großer Teil des ATP vor einem Inaktivieren geschützt wurde). Selbst bei einer Endkonzentration von 0,01 mM PCMP wird die Glycerokinase offenbar innerhalb der gewählten Zeiten bei der gewählten Konzentration genügend inhibiert.

## BEISPIEL 2

Für die Verwendung in einem erfindungsnahen Verfahren wurde die Wirkung der  $\alpha$ -Chlormercuribenzoessäure als Inhibitor in dem Biolumineszenzassay auf ATP bewertet.

### Protokoll:

Unter Verwendung von PCMP und den anderen im Beispiel 1 verwendeten Substanzen wurden folgende Proben hergestellt

Probe	Puffer-Lösung ( $\mu$ l)	ATP ( $\mu$ l)	<u>PCMP</u>	
			( $\mu$ l	Lösung)
1	950	50	100	A
2	900	50	50	A
3	940	50	10	A
4	900	50	50	A
5	940	50	10	B
6	900	50	50	C
7	940	50	10	C
8	950	50	0	-

### Assay:

Von jeder Probe wurden drei Aliquoten von je 100 Mikrolitern entnommen. In diesen Aliquoten wurde ATP wie beschrieben bestimmt.

Ergebnisse:

TABELLE 2

Probe	1	RLA-Wert 2	3	Mittel- wert	% des Kontroll- versuchs	PCMR (mM)
1	11	10	10	10	<1%	10
2	11	10	9	10	<1%	5
3	14576	13556	12956	13696	75	1
4	18190	19413	17224	18142	99	0,5
5	17914	19720	18505	18746	99	0,1
6	17984	17423	17118	17508	95	0,05
7	17959	18219	17484	17887	97	0,01
8	18579	18136	18060	18358	100	0

Schlußfolgerungen:

Es gibt Konzentrationen von PCMR (z.B. 0,01 bis 1 mM), mit denen im Beispiel 1 die Glycerokinase inhibiert werden konnte und die ein Biolumineszenzassay nicht signifikant beeinträchtigen. Daher kann im Rahmen der Erfindung die Kombination von Glycerokinase als Enzym und PCMR als Inhibitor mit Erfolg verwendet werden.

BEISPIEL 3

Es wurde die Wirksamkeit des Dinitrofluorbenzols ("DNFB"), eines Arylhalogenids, als Inhibitor für das Enzym Glycerokinase bestimmt.

Substanzen:

- Inhibitor: Dinitrofluorbenzol, Sigma (90%); verdünnt mit absolutem Ethanol; es wurden folgende Lösungen hergestellt:
- Lösung A: 82,7 mM
- Lösung B: 8,27 mM
- Lösung C: 0,827 mM

Protokoll:

Aus den vorgenannten und vorher beschriebenen Substanzen wurden folgende Proben hergestellt:

Probe	Puffer- lösung ( $\mu$ l)	ATP ( $\mu$ l)	$\text{MgSO}_4$ ( $\mu$ l) <sup>4</sup>	Glycerin ( $\mu$ l)	Glycero- kinase ( $\mu$ l)	DNFB ( $\mu$ l)	Lösung
1	350	50	10	10	10	100	A
2	350	50	10	10	10	100	P
3	350	50	10	10	10	100	C
4	350	50	10	10	10	100	Ethanol

Assay:

Den Proben wurde als letztes Glycerin zugesetzt, um die Wirkung des Enzyms einzuleiten. Vor dem Zusatz des Glycerins wurde von allen Proben eine Aliquote von 50 Mikrolitern genommen. Die ATP-Spiegel in diesen Aliquoten (in PLE-Werten) wurden als Nullzeitwerte bestimmt. Dann wurde den Gemischen Glycerin zugesetzt und wurden nach 5, 10 und 15 min weitere Aliquoten von 50 Mikrolitern genommen. In allen Aliquoten wurde ATP in der beschriebenen Weise bestimmt.

Ergebnisse:

TABELLE 3

Probe	Relative Lichteinheiten (PLE-Werte)					DNFB (mM)
	0 min	5 min	10 min	15 min		
1	8007	7785	7965	7968		2,27
2	7437	1585	1498	1618		0,827
3	7025	11	11	13		0,0827
4	7229	9	10	11		0

Schlußfolgerungen:

Der Vergleich der für die Proben 1 bis 3 erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen für die Probe 4 (Kontrollversuch) zeigen, daß die Glycero-kinase unter den ange-

wendeten Bedingungen und Konzentrationen durch 0,0827 mM DNFB nicht wirksam inhibiert wird, aber bei 0,827 mM mäßig und bei 8,27 mM DNFB wirksam inhibiert wird.

#### BEISPIEL 4

Für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde die Wirkung von Dinitrofluorbenzol als Inhibitor in dem Biolumineszenzassay auf ATP bewertet.

#### Protokoll:

Aus den im Beispiel 3 verwendeten Substanzen wurden folgende Proben hergestellt:

Probe	Puffer- lösung (ul)	ATP (ul)	DNFM (ul)	Lösung
1	850	50	100	A
2	850	50	100	P
3	850	50	100	C
4	850	50	100	Ethanol

#### Assay:

Von jeder Probe wurden drei Aliquoten von je 100 Mikrolitern entnommen. In diesen Aliquoten wurde ATP wie beschrieben bestimmt.

#### Ergebnisse:

TABELLE 4

Probe	1	2	3	Mittel- wert	% des Kontroll- versuchs	DNFB (mM)
1	14498	14780	15076	14784	102.2	8,27
2	16060	15753	15929	15914	110	0,827
3	15157	15625	15507	15429	106	0,0827
4	13597	14203	15583	14461	100	0



Schlußfolgerungen: Aus den Daten der Tabelle 4 geht hervor, daß bei den DNFB-Konzentrationen, bei denen im Beispiel 3 eine Inhibition festgestellt wurde, das mit Leuchtkäfer-luciferase durchgeführte Biolumineszenzassay auf ATP durch das DNFB nicht beeinträchtigt wird.

#### BEISPIEL 5

Es wurde die Wirksamkeit von N-Ethylmaleimid ("NEM") als Inhibitor für das Enzym Glycerokinase bestimmt.

#### Substanzen:

- Inhibitor: N-Ethylmaleimid ("NEM"), Sigma, 416 mM in 10,5% (V/V) Ethanol

#### Protokoll:

Aus den vorgenannten und vorherbeschriebenen Substanzen wurden folgende Proben hergestellt:

<u>Probe</u>	<u>Puffer- lösung (<math>\mu</math>l)</u>	<u>ATP (<math>\mu</math>l)</u>	<u>MgSO<sub>4</sub> (<math>\mu</math>l)</u>	<u>Glycerin (<math>\mu</math>l)</u>	<u>Glycero- kinase (<math>\mu</math>l)</u>	<u>NEM (<math>\mu</math>l)</u>
1	920	50	10	10	10	50
2	920	50	10	10	10	40
3	920	50	10	10	10	30
4	920	50	10	10	10	20
5	920	50	10	10	10	10
6	920	50	10	10	10	0

#### Assay:

Den Proben wurde als letztes Glycerin zugesetzt, um die Wirkung des Enzyms einzuleiten. Vor dem Zusatz des Glycerins wurde von allen Proben eine Aliquote von 50 Mikrolitern genommen. Die ATP-Spiegel in diesen Aliquoten (in

RLE-Werten) wurden als Nullzeitwerte bestimmt. Dann wurde den Gemischen Glycerin zugesetzt und wurden nach 5, 10 und 15 min weitere Aliquoten von 50 Mikrolitern genommen. In allen Aliquoten wurde ATP in der beschriebenen Weise bestimmt.

Ergebnisse:

TABELLE 5					
Relative Lichteinheiten (RLE-Werte)					
Probe	0 min	5 min	10 min	15 min	NEM(mM)
1	7405	7138	6547	6820	19,8
2	7199	7192	7002	6962	15,0
3	7660	7413	6812	6997	12,1
4	7742	7130	6623	6365	8,14
5	7635	7275	6398	5922	4,10
6	7205	13	15	14	0

Schlußfolgerungen: Die Ergebnisse für die Proben 1 bis 5 werden mit denen für die Probe 6 (Kontrollversuch ohne Inhibitor) verglichen. Offenbar wird das Enzym Glycerokinase bei jeder getesteten NEM-Konzentration inhibiert. Dabei steht besonders nach 15 min das Ausmaß der Inhibition in einer gewissen Beziehung zu der NEM-Konzentration.

BEISPIEL 6

Für die Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren wurde die Wirkung von N-Ethylmaleimid als Inhibitor in dem Biolumineszenzassay auf ATP bewertet.

Protokoll:

Aus den im Beispiel 5 beschriebenen Substanzen wurden folgende Proben hergestellt:

Probe	Puffer- lösung ( $\mu$ l)	ATP ( $\mu$ l)	NEM ( $\mu$ l)
1	950	50	50
2	950	50	40
3	950	50	30
4	950	50	20
5	950	50	10
6	950	50	1
7	950	50	0

Assay:

Von jeder Probe wurden drei Aliquoten von je 100 Mikrolitern entnommen. In diesen Aliquoten wurde ATP wie beschrieben bestimmt.

TABELLE 6

Probe	1	2	3	Mittel- wert	% des Kontroll- versuchs	NEM (mM)
1	13534	12596	12111	12747	86,3	19,8
2	12750	13438	13448	13212	89,5	16,0
3	14139	13794	13279	13737	93,1	12,1
4	14401	14667	14756	14608	99,0	8,14
5	14387	14794	14051	14410	97,6	4,10
6	15071	15081	14735	14962	101,4	0,414
7	14759	14643	14859	14753	100,0	0

Schlußfolgerungen: Bei den Konzentrationen, mit denen im Beispiel 5 das Enzym effektiv inhibiert wurde, wird das Biolumineszenzassay auf ATP durch NEM nicht oder nur mäßig beeinträchtigt.

BEISPIEL 7

Die Wirksamkeit des Enzyms Hexokinase zum Inaktivieren von ATP und Inhibierbarkeit durch die

p-Chlormercuriphenylsulfonsäure als Inhibitor wurden bei verschiedenen Konzentrationen des Enzyms bestimmt.

Substanzen:

- Inhibitor: p-Chlormercuriphenylsulfonsäure ("PCMPSA"),  
Sigma Chemical Co.), 50 mM-Lösung in Pufferlösung
- Enzym Hexokinase, Boehringer Mannheim, 140 E/mg, erzeugt  
als Stammlösung von 10 mg/ml in 3,2 M Ammoniumsulfat, die  
vor der Verwendung 1:100 mit Pufferlösung verdünnt wurde.
- Glucose als Akzeptormolekül: Sigma, 100 mg/dl in gesättigter Benzoesäure

Protokoll:

Gemäß der Tabelle 7-1 wurden aus den vorgenannten und vorstehend beschriebenen Substanzen acht Proben hergestellt, die verschieden lang, und zwar 0, 5, 10 bzw. 15 min, inkubiert wurden, ehe Aliquoten genommen und wie beschrieben analysiert wurden.

Ergebnisse:

TABELLE 7-1

<u>Probe</u>	<u>Puffer- lösung (<math>\mu</math>l)</u>	<u>ATP (<math>\mu</math>l)</u>	<u>Glucose (<math>\mu</math>l)</u>	<u>Hexokinase (<math>\mu</math>l)</u>	<u>PCMPSA (<math>\mu</math>l)</u>	<u>Gesamt- volumen (<math>\mu</math>l)</u>
1	890	100	10	-	-	1000
2	880	100	10	10	-	1000
3	870	100	10	20	-	1000
4	840	100	10	50	-	1000
5	870	100	10	-	20	1000
6	860	100	10	10	20	1000
7	850	100	10	20	20	1000
8	820	100	10	50	20	1000

TAFELLE 7-2

Probe	<u>Ergebnisse</u>					
	Hexo- kinase (E/ml)	PCMPSA (mM)	0 min (RLE)	5 min (RLE)	10 min (RLE)	15 min (RLE)
1	--	--	29494	--	29569	29742
2	0,14	--	--	12655	5549	2192
3	0,25	--	--	5760	464	81
4	0,70	--	--	460	14	41
5	--	1,0	29494	--	29569	29742
6	0,14	1,0	--	25884	23717	24771
7	0,25	1,0	--	16116	16228	16519
8	0,70	1,0	--	13353	11760	9375

Schlußfolgerungen: Bei zunehmenden Konzentrationen der Hexokinase (Proben 2 bis 4) und zunehmend längerwerdenden Inkubationszeiten nimmt die Menge des erfaßbaren ATP ab, vermutlich weil das ATP durch das Enzym transphosphoryliert (d.h. "inaktiviert") wird. Bei den Proben 5 bis 8 erkennt man, daß die inaktivierende Wirkung der Hexokinase durch die PCMPSA wenigstens teilweise inhibiert wird.

Aus den Ergebnissen geht ferner hervor, daß in Abwesenheit von Hexokinase durch eine wirksame Konzentration von PCMPSA allein (wie bei der Probe 5) das darauffolgende Biolumineszenzassay im wesentlichen nicht beeinträchtigt wird.

### BEISPIEL 3

Da in dem erfindungsgemäßen Verfahren der Inhibitor häufig gleichzeitig mit einem zweiten Freisetzungsmittel zugesetzt wird, wurden die Wirkungen eines handhablichen zweiten Freisetzungsmittels auf die Inaktivierungswirkung des Enzyms Hexokinase und auf die Inhibition der

Hexokinase durch PCMPSA bestimmt.

Substanzen:

- Zweites Freisetzungsmittel ("ZFM"): Gemisch aus ethoxyliertem quaternärem Amin und quaternären Ammoniumsalzen (UR5, Luman/3M)

Protokoll:

Gemäß der Tabelle 6-1 wurden aus den vorgenannten und vorstehend beschriebenen Substanzen zunehmende Konzentrationen von Hexokinase mit und ohne PCMPSA hergestellt.

TABELLE 6-1

Probe	ZFM ( $\mu$ l)	ATP ( $\mu$ l)	Glucose ( $\mu$ l)	Hexokinase ( $\mu$ l)	PCMPSA ( $\mu$ l)	Gesamt- volumen ( $\mu$ l)
1	350	100	10	--	--	1000
2	350	100	10	10	--	1000
3	370	100	10	20	--	1000
4	340	100	10	50	--	1000
5	370	100	10	--	20	1000
6	350	100	10	10	20	1000
7	350	100	10	20	20	1000
8	320	100	10	50	20	1000

Ergebnisse:

TABELLE 6-2

Probe	Hexo- kinase (E)	PCMPSA (mM)	0 min (PLE)	Ergebnisse	
				5 min (PLE)	10 min (PLE)
1	--	--	26457	--	25234
2	0,14	--	--	5785	1713
3	0,28	--	--	2645	47
4	0,70	--	--	13	15
5	--	1,0	26457	--	25234
6	0,14	1,0	--	15397	15221
7	0,28	1,0	--	11674	12473
8	0,70	1,0	--	4212	3911

Schlußfolgerungen: Man erkennt, daß in Anwesenheit des ZFM Hexokinase durch PCMPSA genügend inhibiert werden kann. Durch die PCMPSA allein wird das mit dem ZFM durchgeführte Biolumineszenzassay auf ATP nicht oder nur sehr wenig beeinträchtigt.

#### BEISPIEL 9

Es wurden die Einflüsse einer bei Zimmertemperatur erfolgenden Lagerung einer Hexokinase-Glucose-Lösung in einer Pufferlösung und in einer ein erstes Freisetzungsmittel enthaltenden Lösung miteinander verglichen. Das gewählte Enzym soll vorzugsweise zum Inaktivieren von ATP in Anwesenheit eines ersten Freisetzungsmittels geeignet sein, weil das Enzym und das erste Freisetzungsmittel gewöhnlich gleichzeitig vorhanden sind und gegebenenfalls auch gleichzeitig zugegeben werden.

#### Substanzen:

- Erstes Freisetzungsmittel ("EFM"): Ethoxyliertes Alkylphenol mit Na-Azid als Konservierungsstoff (MRS, Lumac/3M).

#### Protokoll:

Unter Verwendung der vorgenannten und vorstehend beschriebenen Substanzen wurden zwei Lösungen hergestellt.

- 1: Hexokinase in Pufferlösung: Zu 1,0 ml Pufferlösung wurden 40 Mikroliter der Hexokinase-Stammlösung und 20 Mikroliter der Glucose-Stammlösung zugesetzt.
- 2: Hexokinase im EFM: Zu 1,0 ml des EFM wurden 40 Mikroliter der Hexokinase-Stammlösung und 20 Mikroliter der Glucose-Stammlösung zugesetzt.

Die beiden Gemische wurden als solche bei Zimmertemperatur gespeichert. In Zeitabständen von 1 Stunde wurde die Aktivität der Hexokinase in den beiden Gemischen durch folgendes Assay annähernd bestimmt:

A. Zu 50 Mikrolitern ATP-Lösung wurden 50 Mikroliter Pufferlösung und 100 Mikroliter Luciferase-Luciferin-Lösung zugesetzt. ATP wurde wie beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Spalte A der Tabelle 9-1 angegeben.

B. Zu 50 Mikrolitern ATP-Lösung wurden 50 Mikroliter Hexokinase in Pufferlösung zugesetzt. Diese Lösung wurde 5 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. ATP wurde wie beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Spalte B der Tabelle 9-1 angegeben.

C. Zu 50 Mikrolitern ATP-Lösung wurden 50 Mikroliter des EFM und 100 Mikroliter Luciferase-Luciferin-Lösung zugesetzt. ATP wurde wie beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Spalte C der Tabelle 9-1 angegeben.

D. Zu 50 Mikrolitern ATP-Lösung wurden 50 Mikroliter Hexokinase im EFM zugesetzt, und das Gemisch wurde 5 min stehengelassen. ATP wurde wie beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Spalte D der Tabelle 9-1 angegeben.

Ergebnisse:



TABELLE 2-1

Lagerungszeit (h)	ZUSTAND WÄHREND DER LAGERUNG			
	Hexokinase in Pufferlösung		Hexokinase im EFM	
	A ATP-Ausgangsspiegel (RLE)	B ATP-Restspiegel nach 5 min (RLE)	C ATP-Ausgangsspiegel (RLE)	D ATP-Restspiegel nach 5 min (RLE)
0	40505	3	80214	2228
1	38071	9	50699	2652
2	30090	11	53322	1670
3	42020	10	53809	1175
4	39926	10	54364	2519
5	39495	13	51622	1820
6	39479	12	49937	823
7	39391	11	31499	1099

Schlußfolgerungen: Man erkennt, daß Hexokinase nach der Lagerung ATP in Lösungen inaktivieren kann, die entweder das EFM oder die Pufferlösung enthalten. Die ATP-Restspiegel nach 5 min sind zwar bei Hexokinase im EFM stets höher als bei Hexokinase in Pufferlösung, sie sind jedoch über die ganze Zeit stets niedrig, was besagt, daß die Hexokinase durch eine mindestens 7-stündige Lagerung nicht geschädigt wird.

#### BEISPIEL 10

Es wurden die inaktivierende Aktivität des Enzyms Acetatkinase und seine Inhibierbarkeit durch PCMPSA bestimmt.

#### Substanzen:

- Enzym Acetatkinase: Boehringer Mannheim, 170 E/mg, erhältlich als 1 mg/ml in 3,2 M Ammoniumsulfat
- Magnesiumacetat als Akzeptormolekül: Merck, 0,3 M in bidestilliertem Wasser

Protokoll:

Unter Verwendung der vorgenannten und vorstehend beschriebener Substanzen wurden Proben gemäß der Tabelle 10-1 hergestellt. Zum Einleiten der Enzymwirkung wurde Acetatkinase zugesetzt. Von diesen Proben wurden nach 0, 5, 10 bzw. 15 min Aliquoten von je 100  $\mu$ l Mikrolitern entnommen. Das in diesen Aliquoten enthaltene ATP wurde wie beschrieben bestimmt.

TABELLE 10-1

Probe	EFM (ml)	Magnesium- acetat Endkonz. 3 mM ( $\mu$ l)	Acetat- kinase Endkonz. 1,7 E/ml ( $\mu$ l)	PCMPSP Endkonz. 0,5 mM ( $\mu$ l)
1	1000	10	-	-
2	1000	-	10	-
3	1000	10	10	-
4	1000	10	10	10

Jede Probe enthält ferner:  $MgSO_4$  (10 Mikroliter) für eine Endkonzentration von 5 mM und ATP (100 Mikroliter) für eine Endkonzentration von 1,0  $\mu$ g/ml.

Ergebnisse:

TABELLE 10-2

Probe	RLE-Wert nach			
	0 min	5 min	10 min	15 min
1	5243	5172	5185	5307
2	5232	3316	3096	2992
3	5221	15	12	15
4	4878	2911	2263	2362

Schlußfolgerungen: Die Werte für die Kontrollproben 1 und 2 besagen, daß in Abwesenheit des Enzyms Acetatkinase (Probe 1) oder seines Akzeptormoleküls Mannesiumacetat (Probe 2) der ATP-Spiegel während der ganzen Versuchszeit von 15 Minuten konstant bleibt. Der niedrigere RLE-Wert bei der Probe 2 ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß das in Ammoniumsulfat zugesetzte Acetat ein stärkeres Abschrecken bewirkt.

Die Werte für die Probe 3 besagen, daß unter den angewendeten Bedingungen die Acetatkinase in Gegenwart ihres Akzeptormoleküls ATP sehr wirksam inaktiviert. Das geht aus der Tatsache hervor, daß der ATP-Spiegel nach 5 min fast auf den Untergrundpegel vermindert war.

PCMPSA hat auf Acetatkinase offenbar eine beträchtliche inhibierende Wirkung, weil nach 5, 10 und 15 min. in der Probe 4 (mit PCMPSA) mehr ATP erfaßt wird als in der Probe 3 (ohne PCMPSA).

Daher versteht es sich, daß die Acetatkinase zum Inaktivieren von ATP verwendet werden kann und daß das Enzym offenbar durch PCMPSA inhibierbar ist.

#### BEISPIEL 11

Die inaktivierende Wirkung des Enzyms Glycero-kinase wurde während eines Zeitraums in einem Bereich von Konzentrationen mit der von Apyrase verglichen.

#### Substanzen:

- Apyrase ("Somase", Lumac/3M, defriergetrocknete Apyrase, etwa 4,8 E/Ampulle), mit Pufferlösung auf 1,0 ml aufgefüllt
- Rohmilch: vom örtlichen Vertrieb, Trinkrahm, sterilisiert

Protokoll:

Gemäß der Tabelle 11-1 wurden aus den vorer-  
nannten und aus vorstehend beschriebenen Substanzen vier Pro-  
ben hergestellt, von denen nach 0, 2,5, 5, 10 und 20 min  
Aliquoten genommen wurden.

Ergebnisse:

TABELLE 11-1

Probe	Rohmilch (ul)	EFM (ul)	Glycerin (Endkonz. 3,0 mM)	Glycero- kinase (E/ml)	Apyrase (E/ml)
1	500	500	-	-	0,096
2	500	500	+	0,425	-
3	500	500	+	1,06	-
4	500	500	+	2,12	-

TABELLE 11-2

Probe Nr.	Glycero- kinase (E/ml)	Apyrase (E/ml)	PLE-Wert nach				
			0 min	2,5 min	5 min	10 min	20 min
1	0	0,096	64594	3272	1130	--	243
2	0,425	--	62641	1494	513	290	202
3	1,06	--	57863	721	349	230	149
4	2,12	--	62887	245	197	141	107

Schlußfolgerungen: Man erkennt daß in dem Assay der PLE-  
Wert in den ersten 2,5 min mit höherer Geschwindigkeit ab-  
nimmt als in den darauffolgenden 17,5 min. Die Reaktionsge-  
schwindigkeit von enzymkatalysierten Reaktionen ist häufig  
u.a. auch von den Konzentrationen des Substrats abhängig.  
Die Substrate für Glycero-kinase sind gewöhnlich ATP und Gly-  
cerin. Beim Vorhandensein von Glycerin im Überschuß hängt  
die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Maße von der ATP-Kon-  
zentration ab. Da während der Versuchszeit die ATP-Konzen-

tration sehr schnell abnimmt, nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Die nach 2,5 min erhaltenen RLE-Werte besagen, daß die Geschwindigkeit der Abnahme der RLE-Werte von der Menge (E/ml) der verwendeten Glycerokinase abhängt. Ferner kann man erkennen, daß bei einer Verwendung von Glycerokinase in Konzentrationen von oder über 0,425 E/ml die RLE-Werte signifikant schneller abnehmen als bei 0,096 E/ml Amyrase (in üblichen Protokollen wird häufig 0,096 E/ml Amyrase verwendet).

#### BEISPIEL 12

Es wurde bestimmt, in welchen Konzentrationen von Glycerin und Magnesiumsulfat eine optimale Aktivität der Glycerokinase erzielt wird.

Es hat sich gezeigt, daß bei Endkonzentrationen von Glycerin von 1,5, 3, 6, 15 und 30 mM in Rohmilch:EFM-Lösungen (50:50) die Aktivität von 0,425 E/ml Glycerokinase durch eine Inkubation von 5, 10, 20 oder 30 min nur wenig verändert wird. Daher wird die Geschwindigkeit der Inaktivierung von ATP durch 0,425 E/ml Glycerokinase durch eine Standardkonzentration von Glycerin in einer Größenordnung von etwa 3,0 offenbar nicht begrenzt.

In ähnlicher Weise wurden Versuche mit Magnesiumsulfat in Endkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5 und 10 mM bei 0,425 E/ml Glycerokinase durchgeführt. Da bei zunehmenden Konzentrationen eine geringe Zunahme der Aktivität erkennbar war, wird angenommen, daß eine Endkonzentration von etwa 5 mM zufriedenstellend ist.

### BEISPIEL 13

In diesem Versuch wurde das Freisetzen und Messen von mikrobiellem ATP in einer bereits Glycerokinase enthaltenden Lösung simuliert.

#### Protokoll:

Es wurden Proben aus folgenden Substanzen hergestellt: 1000 Mikroliter Milch (vom örtlichen Vertrieb, Trinkrahm, sterilisiert), 200 Mikroliter EFM, 200 Mikroliter eines handelsüblichen ersten Freisetzungsmittels, das in einer Pufferlösung für die Verwendung mit Proben, wie Obstsäften (F-NRS, Lumac/3M), hergestellt wird, und 2,45 mM  $MgSO_4$ . Etwa verwendetes Glycerin hatte eine Endkonzentration von 1,47 mM. Glycerokinase war in den in der Tabelle 13 angegebenen Konzentrationen vorhanden. Zu Beginn jedes Assays wurde ATP (10 mg/ml) in dem ZFM zugesetzt. Etwa verwendete PCMPSA war in dieser ZFM-Aliquote ebenfalls in einer solchen Menge vorhanden, daß die Endkonzentration 0,5 mM betrug.

Zu Beginn des Assays wurden zu 50 Mikrolitern der betreffenden Probe 100 Mikroliter ZFM/ATP + PCMPSA zugesetzt. Nach 15 min (der normalerweise für die Extraktion von mikrobiellen Nucleotiden mit ZFM verwendeten Zeit) wurden 100 Mikroliter Luciferase-Luciferin-Lösung zugesetzt und wurde ATP wie vorstehend beschrieben gemessen.

#### Ergebnisse:

TABELLE 13

Probe	Glycerin (1,47 mM)	Glycerokinase (E/ml)	PCMPSA 0,5 mM	BLE- Wert	% des Kontroll- versuchs
1	-	0,42	+	28957	100
2	-	1,04	+	21901	100
3	-	2,06	+	15129	100
4	+	0,42	+	26407	91
5	+	1,04	+	17213	78
6	+	2,06	+	6404	58
7	+	0,42	-	1122	4
8	+	1,04	-	72	1
9	+	2,06	-	14	<1

Schlußfolgerungen: Man erkennt, daß (in Abwesenheit von PCMPSA) Glycerokinase in jeder der in den Proben 7 bis 9 verwendeten Konzentrationen in milchhaltigen Proben inaktivierend wirkt. Wenn ein Inhibitor vorhanden ist, werden die Kinetik der stattfindenden Reaktionen und die relativen Konzentrationen und die Zugabezeiten der Reaktionspartner wichtig. Wenn bei jeder der drei Konzentrationen der Glycerokinase der Inhibitor bei einer gegebenen Konzentration zusammen mit ATP in demselben Zeitpunkt zugesetzt wird, nimmt mit der Ausgangskonzentration des Enzyms die ATP-Menge zu, die inaktiviert wird, bevor das Enzym vollständig inhibiert werden kann. Aber ATP kann in jeder Probe festgestellt werden, und es können Signale in der Nähe der Kontrollspiegel festgestellt werden, wenn die Ausgangssignale des Enzyms genügend niedrig sind, wie in den Proben 4 bis 6.

#### BEISPIEL 14

Die Wirkung und die Inhibition von Glycerokinase wurden in zwei verschiedenen Proben - Milch und Orangensaft -

bestimmt, die häufig in Biolumineszenzassays auf mikrobielle Verunreinigung getestet werden.

### Protokoll:

Es wurden Orangensaftproben mit 500 Mikrolitern Orangensaft (Biedel, Niederlande, ohne Konservierungsstoffe, pasteurisiert), 500 Mikroliter gepuffertes EFM, 3 mM Glycerin und gegebenenfalls 0,5 mM PSMPSA hergestellt und bei vier verschiedenen Glycerokinasekonzentrationen 0, 5, 10 bzw. 20 min lang inkubiert.

Auf ähnliche Weise wurden Proben mit Milch hergestellt, bei denen 500 Mikroliter Rohmilch (frisch, vom örtlichen Bauern) und 500 Mikroliter EFM anstelle des gepufferten EFM verwendet wurden.

### Ergebnisse:

TABELLE 14

Glycerokinase (E/ml)	PDMPSA	PLE-Wert nach			
		0 min	5 min	10 min	20 min
Probe: Orangensaft					
0,25	-	113796	3449	249	146
0,25	+	142369	145464	150927	155092
1,06	-	141794	23160	1254	145
2,12	-	133443	5865	174	140
2,12	+	152487	143354	132269	151899
4,25	-	109249	4175	152	83
4,25	+	116232	131999	123137	125784



Glycerokinase (E/ml)	PCMPSA	PLE-Wert nach			
		0 min	5 min	10 min	20 min
Probe: Rohmilch					
0,85	-	952	111	55	38
0,85	+	1362	1494	1348	1280
1,06	-	1093	209	120	54
2,12	-	629	140	70	38
2,12	+	829	1340	1342	1233
4,25	-	502	110	48	34
4,25	+	1173	1314	1374	1028

Schlußfolgerungen: Die Ergebnisse der mit Orangensaft bzw. Milch durchgeführten Versuche besagen, daß ohne Inhibitor durch Glycerokinase selbst bei der geringsten Aktivität während eines Zeitraums von 20 min im wesentlichen alles in den Proben vorhandene ATP inaktiviert wird.

Ferner erkennt man, daß die gewählte Konzentration des Inhibitors zum Inhibieren des Enzyms selbst in den höchsten verwendeten Konzentrationen genügt.

#### BEISPIEL 16

Für die schnelle Erfassung von Mikroorganismen in Rohmilchproben wurde ein im technischen Maßstab durchführbares Protokoll erarbeitet.

Es wurde eine EFM-Stammlösung hergestellt, die 3,0 mM Glycerin und 5,0 mM  $MgSO_4$  enthielt. Ferner wurde eine ZFM-Stammlösung hergestellt, die als Inhibitor 0,5 mM PCMPSA enthielt. Unmittelbar vor einem Assay wurde mit dem EFM/Glycerin/ $MgSO_4$  eine Lösung hergestellt, die 1,275 E/ml Glycerokinase enthielt.

Protokoll:

1. 25 Mikroliter Rohmilch werden in eine Küvette gegeben.
2. 100 Mikroliter der EFM/Glycerokinase-Lösung werden zugesetzt.
3. Die Küvette wird 5 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen.
4. Die Küvette wird in die Zählkammer eines Photometers eingesetzt.
5. Es werden 100 Mikroliter ZFM/Inhibitor zugesetzt.
6. Nach einer Inkubation von 10 oder 15 s werden 100 Mikroliter Luciferase-Luciferin-Lösung zugesetzt.
7. Das Licht wird während einer Integrationszeit von 10 s gemessen, und die RLE-Werte werden aufgezeichnet.

Es ist eine enge Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,91) zwischen dem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmten mikrobiellen ATP und der Anzahl der mikrobiellen Zellen festzustellen, die als koloniebildende Einheiten erfassbar sind, wenn Verdünnungen derselben Proben auf Selektivagarplatten aufgebracht, 48 h bei 32°C inkubiert und nach üblichen Verfahren gezählt wurden.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum selektiven Bestimmen von mikrobiellen Nukleotiden in einer Probe, von der vermutet wird, daß sie sowohl nichtmikrobielle als auch mikrobielle Zellen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

(1) nichtmikrobielle Nukleotide werden selektiv freigesetzt;

(2) im wesentlichen alle freigesetzten nichtmikrobiellen Nukleotide werden durch die Verwendung einer wirksamen Menge eines inaktivierenden Enzyms inaktiviert, das keine Hydrolase ist und das durch einen spezifischen Inhibitor inhibierbar ist,

(3) durch die Verwendung einer wirksamen Menge eines spezifischen Inhibitors wird das inaktivierende Enzym im wesentlichen vollständig inhibiert,

(4) mikrobielle Nukleotide werden selektiv freigesetzt und

(5) durch ein geeignetes Assay wird eine statistisch signifikante Menge der freigesetzten mikrobiellen Nukleotide erfaßt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erfaßten mikrobiellen Nukleotide Adenosintriphosphatnukleotide sind.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

10. Materialsatz zum Durchführen des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Materialsatz vorherbestimmte und einzeln verpackte Mengen des inaktivierenden Enzyms und des ihm entsprechenden spezifischen Inhibitors enthält.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**